

第16回実験動物セミナー研究成果発表会抄録

Abstracts of the 16th Seminar of Laboratory Animal Center

2005年12月13日 山形大学医学部視聴覚教室

1. Ghrelin Inhibits Glucose-Stimulated Insulin Secretion by Autonomic Nervous System in Wistar Rats

Can Cui, Hiroshi Ohnuma, Makoto Daimon, Hiroshi Yamaguchi, Wataru Kameda, Yumi Jimbu, Toshihide Oizumi, Takeo Kato (Third Department of Internal Medicine, Yamagata University School of Medicine)

Abstract Aims/hypothesis In the paper we intended to investigate the effect of ghrelin on insulin secretion and its mechanism. **Methods** $1\text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ rat ghrelin was administered to normal male Wistar rats (ages: 98 ± 7 days; body weight: $262 \pm 20.2\text{ g}$) by two different infusion paths, intra-portal venous glucose tolerance test or intra-femoral venous glucose tolerance test, at the rate of 1 ml/l by a pump. And to discuss the possible way ghrelin following, cholinergic and sympathetic modulations were checked. $800 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ atropine methyl bromide (an antagonist of muscarinic cholinergic receptors) or $15 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ phentolamine mesylate (a non-selective alpha-adrenergic blocker) along with $1\text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ghrelin were performed. **Results** Compared with control group $1\text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ghrelin given from portal vein inhibited the glucose-stimulated secretion of insulin ($p < 0.05$), however infused from femoral vein ghrelin exerted no significant effect on insulin secretion. In the IP co admission ghrelin and atropine or phentolamine groups, atropine and phentolamine recovered the inhibitory effect of ghrelin on insulin response ($P = 0.017$ and $P = 0.002$, respectively). **Conclusions/interpretation** The inhibitory effect of ghrelin on insulin response on intra-portal venous glucose tolerance test was not mediated by its direct vascular perfusion to the pancreas but by its passage through the portal vein. The study indicated that autonomic nervous system is the major pathway that conveys the signal of ghrelin from the portal vein to pancreas for such inhibitory effect on insulin release.

Key words : Ghrelin, Insulin secretion, IPGTT (intra-portal venous glucose tolerance test), IVGTT (intravenous glucose tolerance test), autonomic system

2. ラット下垂体前葉のグルタミン酸について

白澤信行, 孫英傑, 曾爾疆*, 内藤輝 (山形大学医学部形態構造医学, *名古屋市立大学大学院医学研究科制御形態学)

ホルモン分泌細胞を囲みネットワークを形成する濾胞星状 (FS) 細胞は、グルタミン (Gln) 合成酵素 (GS) を持つ。FS 細胞は周囲の Glu 濃度を下げる役割を果たすと考えられることから、Glu の動態を研究した。【方法】正常雄ラットを用い、免疫組織化学法と RT-PCR 法で解析した。【結果】前葉では、1) GS は FS 細胞に、

2) Glu 脱炭酸酵素は FS 細胞に、3) Glu 脱水素酵素 (GDH) は Golgi 装置に認められ、4) GS, GDH, Glu-Cys ligase, Glutaminase 酵素遺伝子と、5) *slc1a1*, *slc1a3*, *slc17a6*, *slc17a7*, *slc38a1*, *slc2*, *slc4* の Glu トランスポーター遺伝子と、6) *GluR*, *GABAR*, *NMDAR* などアミノ酸受容体遺伝子が多く発現しており、Glu の供給と変換は前葉でも行われていることが示唆された。

3. 慢性脳虚血における高次脳機能低下と oligodendrocyte の再生に関する検討

千田裕一郎, 小久保安昭, 松森保彦, 久下淳史, 竹村直, 佐藤慎哉, 嘉山孝正 (山形大学大学院医学系研究科生命環境医科学専攻神経機能再生学講座)

【目的】慢性脳虚血における oligodendrocyte (OLG) の再生に関する検討を行い、神経機能再生における OLG の役割を明らかにすることを目的とした。【方法】SD ラット (雄、 $230 \pm 20\text{ g}$) 永久両側総頸動脈結紮により慢性脳虚血モデルを作製し、術後 2、4、6、8 w において脳梁における抗 NG2 抗体 (未熟 OLG のマーカー) 抗 GST- 抗体 (成熟 OLG のマーカー) 免疫染色を行い、陽性細胞数を検討した。また高次脳機能評価は water-maze test にて行った。【結果・考察】NG2 陽性細胞は増加の傾向を示し、ピークは術後 4 w であった。一方 GST- 陽性細胞は 4 w で減少のピークを迎えた後、増加の傾向を示したことから OLG の再生が考えられた。water-maze test の結果、全ての週において成績が不良であった。以上より組織学的に OLG は減少後回復を認めたものの、高次脳機能障害は残存していた。

4. ラット大腿骨部分欠損モデルを用いた recombinant human bone morphogenetic protein 2 併用同種骨髓幹細胞移植による骨形成能に関する研究

高野満夫, 土田浩之*, 橋本淳一, 荻野利彦 (山形大学医学部運動機能再建・回復学分野, *山形大学医学部急性期生体機能統御学分野)

骨髓間葉系幹細胞同種移植にヒト組み換え骨形成蛋白を併用し、免疫抑制薬 FK506 の投与条件による骨形成の違い、移植細胞の役割の検討を目的として実験を行った。ドナーは Lewis 雄ラット、レシピエントは Brown Norway 雌ラット (同種異系) と Lewis 雌ラット (同種同系) を用いた。同種異系モデルで、A 群は、FK506 ($1\text{ mg}/1\text{ kg}$ 体重) を術後 1 週間連日投与後に隔日投与を 1 週間行い、B 群は手術当日に FK506 ($10\text{ mg}/1\text{ kg}$ 体重) を単回投与した。同種同系モデルを C 群とした。軟 X 線による評価、組織学的評価、fluorescence in situ hybridization により移植細胞の生存期間と部位を評価した。3 群とも良好な骨形成が得られた。術後 4 - 6 週で B 群よりも A 群で移植細胞が多く生存し、移植細胞は術後早期の骨形成に関与しており、長期の免疫抑制は不要と考えられた。

5. SOD1 欠損により腎臓の虚血再灌流傷害は悪化する

山辺拓也^{***}, 岡田太^{*}, 井内良仁^{*}, 小沼邦重^{*},
富田善彦^{**}, 藤井順逸^{*} (*山形大学大学院生命環境医科学学生
体分子機能学, **山形大学医学部腎泌尿器外科学)

腎臓の虚血再灌流時には大量の活性酸素種が生成し、それが急性腎不全の原因の一つと考えられている。Superoxide dismutase (SOD) などの抗酸化酵素はこうした活性酸素種からの防御にはたらく。今回 SOD1 欠損マウスを用いて、腎臓の虚血再灌流傷害における役割を調べた。右腎を摘出し、2 週間後に左腎動静脈をクリッピングして虚血とした。45 分後に再灌流し、1 日もしくは 7 日後に blood urea nitrogen と creatinine を測定して腎機能を評価した。その結果、(-/-) マウスで腎機能低下が著しく、週齢の進んだマウス程傷害の程度は増悪した。酸化ストレスマーカーの 1 つ 8-hydroxyguanine の免疫組織学的検討でも、増加が認められた。SOD1 欠損は健常マウスの腎機能には影響を与えないが、虚血再灌流に伴う腎機能傷害を増強することが分かった。

6. 「老化とポリフェノールの冠循環改善効果」第 3 報：高コレステロール血症ラットにおけるポリフェノール化合物含有赤ワイン凍結乾燥品 (RWPC) の長期投与効果

新里悦子, 小川裕子, 岡崎有恵, 五十嵐祐子, 長谷川由希,
下田智子, 利美賀子, 会田智美, 石幡明^{*}, 片野由美 (*山形
大学医学部臨床看護学講座, *同器官機能統御学講座)

食餌性高コレステロール血症ラットの冠循環機能に対して、RWPC 長期投与が改善効果を持つか否かを検討した。実験には 2 ヶ月齢の雄性 Fischer344 ラットを用い、通常の餌を投与する対照群、通常の餌に 4 % コレステロールを混合した餌を投与する Cho 群、Cho 群の餌に約 0.62% RWPC を混合した餌を投与した RWPC 群の 3 群に分け、3 ヶ月間飼育した。摘出灌流心臓に A (10^{-7} M) と ET-1 (10^{-7} M) を投与し、冠流入量 (CF) を測定した。各群の体重、心重量に有意差は認められなかった。RWPC 群における A の CF 減少には、Cho 群と有意差は認められなかったが、RWPC 群の方が Cho 群よりも速やかな CF の回復傾向が見られた。ET-1 は持続的な冠血管収縮作用を惹起した。Cho 群では CF が持続的に減少し続けるのに対し、RWPC 群では減少が抑えられた。以上より、RWPC 長期投与は A や ET-1 による血管収縮からの回復を促進することにより循環改善効果をもたらすことが示唆された。